植 物 分 类 与 资 源 学 报　2011, **33** (2): 225～228
Plant Diversity and Resources　　DOI: 10.3724/SP.J.1143.2011.10155

菘蓝花药培养及单倍体的诱导*

李　焘, 林文媛, 王喆之**
(陕西师范大学药用资源与天然药物化学教育部重点实验室 西北濒危药材资源开发
国家工程实验室, 陕西 西安　710062)

摘要: 探讨菘蓝花药处于单核晚期的形态指标, 并以适宜发育时期的花药为外植体, 进行花药培养及单倍体诱导。实验结果表明, 4℃低温处理 2 d 后, 在含有 6-BA 0.5 mg·L^{-1} 和 NAA 1.0 mg·L^{-1} 的 MS 培养基上, 花药愈伤组织的诱导率为 23.35%; 将其转接到 MS 附加 6-BA 1.0 mg·L^{-1}, NAA 0.5 mg·L^{-1} 的分化培养基上, 80.00% 以上的愈伤组织可以诱导产生不定芽; 再将分化出的试管苗转接到 1/2MS+NAA 1.0 mg·L^{-1} 的生根培养基上, 3 d 左右即可获得完整植株。经叶边缘压片检查染色体数目, 花药培养所得的弱小绿苗为单倍体植株。

关键词: 菘蓝; 花药培养; 单倍体
中图分类号: Q 943.1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 2095-0845(2011)02-225-04

Anther Culture and Haploid Induction from *Isatis indigotica* (Cruciferae)

LI Tao, LIN Wen-Yuan, WANG Zhe-Zhi**
(*Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University*, Xi'an 710062, China)

Abstract: Anther culture and haploid induction were carried out from *Isatis indigotica*. The experimental results showed that cold pretreatment could increase the induction rate of callus. The induction rate of callus was 23.35% after 2 days of cold pretreatment. Then the calluses were successively transferred to differentiation medium (MS+BA 0.5 mg·L^{-1}+ NAA 1.0 mg·L^{-1}) and rooting medium (1/2MS+NAA 1.0 mg·L^{-1}). The complete plants were obtained 3 days later. Among which, those weak and green plantlets were haploids with 7 chromosomes.

Key words: *Isatis indigotica*; Anther culture; Haploid

菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 为十字花科 (Cruciferae) 菘蓝属 (*Isatis*) 二年生草本植物, 其根 (板蓝根) 和叶 (大青叶) 均可入药, 是 2010 版《中国药典 (一部)》收录的常用中药品种, 原产我国, 全国各地均有栽培。菘蓝具有清热解毒、凉血消斑、利咽止痛之功效, 含有靛蓝、靛玉红、有机酸、多糖等多种有效成分, 广泛用于治疗流感、腮腺炎、乙脑、肝炎等多种疾病, 其多糖组分具有一定的免疫调节和降血脂作用, 而靛玉红对治疗慢性粒细胞白血病有较好的作用 (刘海利, 2002)。

单倍体育种过程中, 植株经染色体加倍后, 在一个世代中即可出现纯合二倍体, 其性状不分离, 表型整齐一致, 育种年限显著缩短。由于没

* 基金项目: 陕西省科技攻关计划 (2009K19-07)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: zzwang@snnu.edu.cn
收稿日期: 2010-09-14, 2010-12-20 接受发表
作者简介: 李焘 (1976-) 女, 博士生, 讲师, 主要从事药用植物资源开发应用研究。E-mail: litao@snnu.edu.cn

有显性基因的掩盖，隐性基因控制的性状容易显现，这对诱变育种和遗传突变研究具有较大的优势。我国应用单倍体育种技术先后育成了烟草、水稻、小麦等多个优良品种。目前，关于菘蓝组织培养及植株再生体系建立的文献较多（涂玉琴等，2009；张菊红等，2006；张胜珍等，2009；汪洪等，2008），但有关菘蓝花药培养及单倍体诱导的研究尚未见报道。本实验以菘蓝花药为试材，研究花药培养及植株再生的适宜条件，以期为菘蓝单倍体育种提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2009年4–5月间，随机抽取种植于本校试验田二年生的菘蓝花药为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 小孢子发育时期的检测 取材当日7：00–10：00摘取生长健壮、无病虫害、直径不同、闭合的菘蓝花蕾，同时观察记录花蕾特征和花药颜色；将花药置于卡诺固定液中处理24 h后，用改良苯酚试剂染色，压片镜检花粉小孢子的发育时期。

1.2.2 花药的预处理与培养 将花蕾置于4℃冰箱，分别进行0、2、4、8和12 d的预处理。接种前，将花蕾用流水冲洗1～2 h，常规消毒后用滤纸吸干表面水分，小心剥取花药，并接种于不同的培养基中进行培养。观察并记录愈伤组织诱导、不定芽分化与增殖、植株再生等情况。

1.2.3 培养条件 培养用基本培养基为MS，附加琼脂6.5 $g\cdot L^{-1}$，蔗糖30 $g\cdot L^{-1}$，灭菌后pH值为5.8左右。培养室温度为（25±2）℃，光照强度为2 000～3 000 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$，每天光照12～14 h。

1.2.4 再生植株的倍性鉴定 将试管苗叶片于流水中冲洗10 min，再用蒸馏水冲洗3次；切取叶边缘组织，并用0.002 $mol\cdot L^{-1}$ 8-羟基喹啉预处理2 h，于卡诺固定液中固定24 h；转入1 $mol\cdot L^{-1}$ HCl中解离10 min，改良苯酚品红试剂染色20 min，压片、镜检染色体数目并拍照（段英姿等，2006）。同法取正常二倍体菘蓝试管苗为对照，进行染色体制片并计数、拍照。

2 结果与分析

2.1 小孢子发育时期的鉴定

镜检结果表明，花蕾直径小于0.15 cm时，小孢子发育不成熟或处于单核早期，培养过程中，细胞分裂能力差，花药存活力低；直径大于0.25 cm时，花蕾逐渐展开，花冠黄色，小孢子已发育至双核至三核期，不宜作为花药培养的外植体；而直径在0.15～0.25 cm之间的闭合花蕾，花冠呈淡绿色至淡黄色，50%以上的小孢子处于单核中期至后期（靠边期）。因此，菘蓝花药培养时，宜在取材当日选取健康、无病虫害，花冠颜色为淡绿至淡黄色，直径0.15～0.25 cm、闭合花蕾中的花药作为单倍体诱导的适宜外植体。

2.2 花药愈伤组织的诱导

2.2.1 不同激素组合对花药愈伤组织诱导的影响 接种一周左右，部分花药开始膨大、纵裂并伴有愈伤组织的形成。随着培养时间的延长，整个花药完全脱分化成黄绿色、疏松的愈伤组织（图1：a），并最终转为绿色、结构致密的愈伤组织（图1：b），不同激素组合对愈伤组织诱导的影响作用如表1所示。

表1 不同激素组合对花药愈伤组织诱导的影响*

Table 1 Effects of different hormone combinations on the induction rate of callus for *I. indigotica*

BA ($mg\cdot L^{-1}$)	NAA ($mg\cdot L^{-1}$)	2,4-D ($mg\cdot L^{-1}$)	初愈时间 Time of callus formation (d)	接种花药数 No. of anther	形成愈伤组织块数 No. of callus formation	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus (%)
0.5	1.0	0	6	226	46	20.35
0.5	1.0	1.0	10	42	5	11.90
0.5	1.0	2.0	10	44	6	13.64
0.5	2.0	1.0	10	45	6	13.33
0.5	2.0	2.0	10	47	7	14.89
0.5	3.0	1.0	11	44	5	11.36
0.5	3.0	2.0	12	44	5	11.36
1.0	1.0	1.0	10	44	6	13.64
1.0	1.0	2.0	11	42	5	11.90
1.0	2.0	1.0	11	44	5	11.36
1.0	2.0	2.0	12	43	4	9.30
1.0	3.0	1.0	11	44	6	13.64
1.0	3.0	2.0	12	40	6	15.00

*接种30 d后的统计结果。

* Results of inoculation for 30 days

从表1可以看出，花药在MS附加6-BA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$和NAA 1.0 $mg\cdot L^{-1}$的培养基中，经过6 d的培养即可诱导愈伤组织形成，诱导率为20.35%；而添加了2,4-D的培养基组合中愈伤

组织的诱导率分别在 9.30% 到 15.00% 之间不等。同时，添加 2,4-D 后愈伤组织的形成时间明显推迟至 10 d 以上，推测 2,4-D 对菘蓝花药愈伤组织的形成具有一定的抑制作用。因此，适宜菘蓝花药愈伤组织诱导的培养基为 MS 附加 6-BA 0.5 mg·L^{-1}和 NAA 1.0 mg·L^{-1}。

2.2.2　不同低温预处理对花药愈伤组织诱导的影响　与对照组相比，适当的低温预处理能够在一定程度上提高愈伤组织诱导率，同时缩短愈伤组织的形成时间。如 2 d（23.35%）和 4 d（18.57%）的低温预处理均较对照（15.26%）明显地提高了愈伤组织诱导率。在相同的培养基中，与 2.2.1 项的结果（20.35%）相比，2 d 的低温预处理（23.35%）可以进一步提高愈伤组织诱导率；而较长的低温预处理时间会在一定程度上降低愈伤组织诱导率，并延长其形成时间。因此，适宜菘蓝愈伤组织诱导的低温预处理时间为 2 d。观察结果表明，花药培养一段时间后，药隔处首先开裂，进而形成淡黄色的愈伤组织（图 1：a）。培养初期愈伤组织生长缓慢，随后逐渐加快，7 d 左右愈伤组织块直径可达 1.5 cm 以上，颜色由淡黄转为淡绿，质地由疏松转为致密（图 1：b）。

表 2　低温预处理时间对花药愈伤组织诱导的影响*

Table 2　Effects of low temperature pretreatment on the induction rate of callus for *I. indigotica*

处理时间 Treatment time（d）	初愈时间 Time of callus formation（d）	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus（%）
0	7	15.26
2	6	23.35
4	10	18.57
8	13	14.61
12	20	10.35

* 接种 30 d 后的统计结果。* Results of inoculation for 30 days

2.3　花药愈伤组织的增殖、分化及完整植株的获得

将花药愈伤组织接种到 MS 附加 6-BA 1.0 mg·L^{-1}和 NAA 2.0 mg·L^{-1}的培养基中，经过 25 d 左右的培养，愈伤组织旺盛生长并明显增殖。2～3 次继代培养后，将其转入 MS 附加 6-BA 1.0 mg·L^{-1}，NAA 0.5 mg·L^{-1}的培养基中，6 d 左右可以见到绿色芽点的形成，芽点经进一步生长形成不定芽（图 1：b），且形成率达到 80.00% 以上。每块愈伤组织上形成不定芽的个数不等，25 d 时统计不定芽的平均增殖倍数约为 8（图 1：c）。待不定芽长至 2～3 cm 高时将其切下，转入 1/2MS 附加 NAA 1.0 mg·L^{-1}的培养基中，3 d 左右即可生根（图 1：d），生根率为 100%。待根长至 4～5 cm 长时（图 1：e），可以进行移栽。

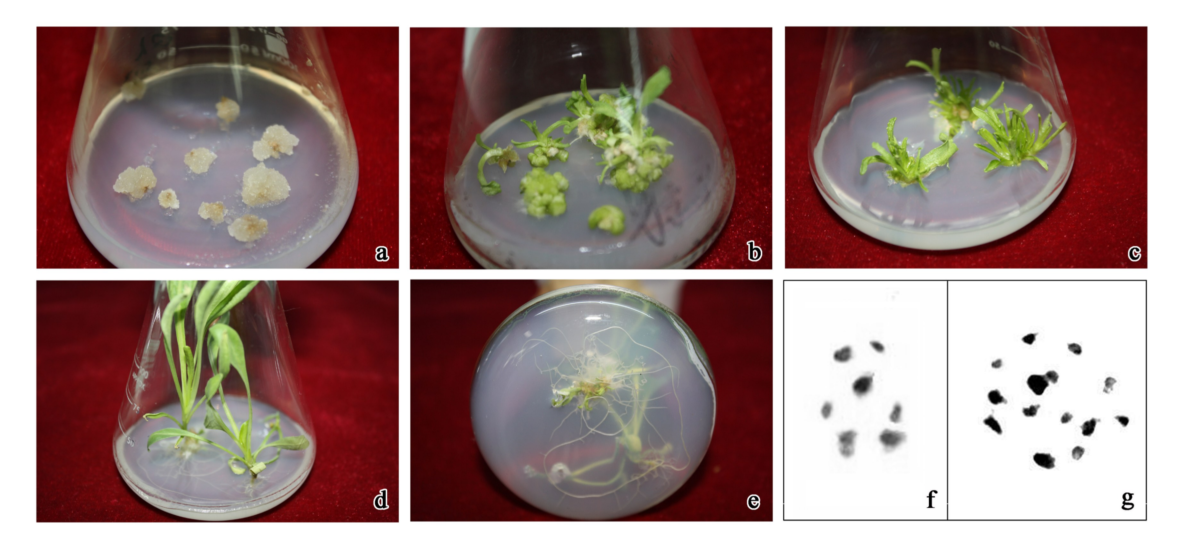


图 1　菘蓝花药培养及单倍体诱导

a. 黄绿色疏松愈伤组织；b. 绿色致密愈伤组织，并有不定芽形成；c. 不定芽丛；d. 试管苗；e. 试管苗基部诱导产生的根；f. 单倍体染色体（n=7）；g. 二倍体染色体（2n=14）

Fig 1　Anther culture and haploid induction for *I. indigotica*

a. Yellow-green loose callus; b. Green dense callus and shoot *in vitro*; c. Shoots; d. Tube seedlings; e. Root; f. Haploid with 7 chromosomes; g. Diploid with 14 chromosomes

2.4 再生植株的倍性鉴定

从再生植株的形态和生长情况来看，经花药培养获得的单倍体植株较为弱小，且生长较慢；而二倍体植株形态正常，生长旺盛，在培养基中呈现优势生长。分别取对照和经花药培养所得植株的叶边缘进行染色体制片并计数，对其进行染色体倍性鉴定。从图1：f，g可以看出，经花药培养所得植株的染色体（$n=7$）明显减少，为正常二倍体植株（$2n=14$）的一半；而同一植株中部分细胞的染色体数目还存在9条、10条、13条等情况，说明在愈伤组织诱导过程中产生了一定数量的非整倍体。因此，对于菘蓝单倍体植株的选育仍有待进一步研究。

3 讨论

低温处理可以有效地改变小孢子的配子体发育途径，启动孢子体发育途径，显著提高小孢子愈伤组织或胚状体的发生频率；在一定程度上延缓小孢子退化，提早雄核发育，增加参与雄核发育的小孢子的比率（Li等，2008）。不同植物花药低温预处理的时间不同，温度条件也存在差异。菘蓝花药培养的过程中，适宜的低温预处理能够提高愈伤组织诱导率，并缩短愈伤组织形成时间；但随着预处理时间的延长，诱导率会随之下降。在本研究中，低温预处理2 d可以提高菘蓝花药愈伤组织诱导率。

研究结果表明，菘蓝花药愈伤组织诱导的适宜条件为MS附加6-BA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$和NAA 1.0 $mg\cdot L^{-1}$，其诱导率为23.35%。与正常二倍体菘蓝叶片和叶柄的愈伤组织诱导结果（叶片和叶柄的愈伤组织诱导率分别为97.50%和80.00%，苗永美等，2008）相比，花药愈伤组织诱导率偏低。这可能与花药较高的分化水平、不同材料基因型的差异、以及培养条件等都有一定的关系。大多数禾本科植物，如水稻（李大林，2000）、小麦（裴翠娟等，1992）、大麦（魏凌基等，1995）等的花药培养中，2,4-D是启动小孢子细胞形成愈伤组织的必要条件。而菘蓝花药培养过程中2,4-D对愈伤组织的诱导表现出一定的抑制效应，这与大多数植物花药培养的研究结果不同，这种抑制效应的机制如何，尚有待于从物质代谢、激素水平和酶活性等方面进行较为深入地探讨。

迄今为止，未见有菘蓝花药培养及单倍体诱导的研究报道，本文从菘蓝花药低温预处理、激素组合等方面进行了研究，希望能为菘蓝的花药培养、单倍体诱导及育种等提供一定的研究依据。

〔参考文献〕

Duan YZ (段英姿), Chen YQ (陈玉琴), Chai FR (柴凤瑞), 2006. A study on induction of polyploidy in *Isatica indicago* by colchicine treatment [J]. *Journal of Tangshan Teachers College* (唐山师范学院学报), **28** (2): 21—23

Li DL (李大林), Zhang YJ (张云江), Liu DL (刘大力), 2000. Discussion on improvement of method of rice anther culture [J]. *Heilongjiang Agricultural Science* (黑龙江农业科学), **2**: 19—22

Li JQ, Wang YQ, Lin LH *et al.*, 2008. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, **115**: 329—336

Liu HL (刘海利), Wu LJ (吴立军), Li H (李华) *et al.*, 2002. Study on the chemical constituents of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University* (沈阳药科大学学报), **19** (2): 93—95

Miao YM (苗永美), Jian X (简兴), Shi J (石静), 2008. Study on callus induction of two explants in *Isatis indigotica* [J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), **1**: 147—150

Pei CJ (裴翠娟), Hu H (胡含), Liu CH (刘成华), 1992. A study on the factors affecting induction rate of anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Hebei Agricutural University* (河北农业大学学报), **15** (3): 17—20

Tu YQ (涂玉琴), Sun J (孙建), Ge XH (葛贤宏) *et al.*, 2009. Production and analysis of intertribal hybrid calli from protoplast fusion between *Isatis indigotica* Fort. and *Brassicaoleracea* L. var. *alboglabra* Bailey [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* (中国油料作物学报), **31** (4): 522—526

Wang H (汪洪), Wang XH (王晓慧), Wang YH (王艳红) *et al.*, 2008. Hairy root induction of *Isatis indigotica* Fort. and plantlet regeneration [J]. *Crops* (作物杂志), **5**: 31—35

Wei LJ (魏凌基), Wang YX (王咏星), Zhang W (张薇), 1995. A preliminary report on the study of *Hordeum Sativum* Jess's anther *in vitro* culture and plantlet regeneration [J]. *Journal of Shihezi Agricutural College* (石河子农学院学报), **13** (4): 60

Zhang JH (张菊红), Xie J (谢妤), Wang CG (汪承刚) *et al.*, 2006. Application of orthogonal design in tissue culture of *Isatis tinctoria* [J]. *Journal of Hubei University* (*Natural Science*) (湖北大学学报（自然科学版）), **28** (2): 183—186

Zhang SZ (张胜珍), Ke SY (客绍英), Meng WX (孟文霞) *et al.*, 2009. Study on domestication and transplanting technique of tissue culture plantlets of *Isatis indigotica* Fort [J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), **2**: 237—240